

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18199

研究課題名（和文）体液・糞便中メタボローム解析を通じたヒト母子の化学物質曝露影響解析

研究課題名（英文）Analysis of chemical exposure effects in human mothers and children through metabolomic analysis of body fluids and feces

研究代表者

江口 哲史 (Akifumi, Eguchi)

千葉大学・予防医学センター・助教

研究者番号：70595826

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では日本の出生コホートおよび、ベトナム鉛バッテリー汚染地域より得た試料中の化学物質濃度およびメタボローム組成を測定し、化学物質の曝露がヒト健康に及ぼす影響について解析を試みた。日本の出生コホートにおいては、ポリ塩化ビフェニルの曝露が子供の出生体重低下に関与している可能性が示唆されたが、血清・便試料中のメタボローム組成との間には明確な関係は認められなかった。一方、鉛バッテリー汚染地域においては鉛曝露と尿中メタボロームの組成の間に関係が認められ、中枢神経毒性や腎毒性、ヘム合成に関連するパスウェイの変動を通じて鉛がヒトの健康に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、化学物質の曝露が健康影響に及ぶまでの間に、体内における代謝がどのように変化するかについて着目し、影響が現れるまでのメカニズムを明らかにしようとするものである。毒性・健康影響発現までのメカニズムを明らかにすることができれば、影響が及ぶ前に介入などを試みることで、化学物質曝露による健康影響を低減するための手法開発に結びつく可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the effects of chemical exposure on human health by measuring the concentration and metabolomic composition of chemicals in samples obtained from a Japanese birth cohort and from a lead battery contaminated area in Vietnam. In the Japanese birth cohort, it was suggested that exposure to polychlorinated biphenyls may be involved in the lowering of birth weight in children, but no clear relationship was found between the exposure and metabolome composition in serum and feces samples. On the other hand, a relationship was found between lead exposure and urinary metabolome composition in lead battery contaminated areas, suggesting that lead may have adverse effects on human health through alterations in pathways related to central nervous system toxicity, nephrotoxicity, and heme biosynthesis.

研究分野：環境分析化学

キーワード：残留性有機汚染物質 鉛 メタボロミクス コホート調査

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

成人期発症の非感染性慢性疾患の発症リスクが、遺伝的素因や成人における生活習慣だけでなく、胎児期や乳児期の環境に影響されるという DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 仮説が近年広く支持されている。喫煙習慣や母体の栄養状態などはこれまでもその影響が報告されているが、これらに加え、化学物質の曝露が胎児に及ぼす影響についても注目が集まっている。ポリ塩化ビフェニル (PCBs) に代表される残留性有機汚染物質 (POPs) や鉛、水銀をはじめとする重金属類は、今なお多様な生物・環境媒体から検出されている。これら POPs、重金属類の曝露による脳神経系の発達や、生活習慣病発症リスクの上昇が疫学研究においても報告されており、なかでも曝露影響を強く受けることが知られている乳幼児への影響が特に懸念されている。

しかしながら、化学物質の曝露と疾患リスクの上昇や低出生体重の関係を解析した研究の多くは実験動物や細胞を用いた研究や、コホート調査においてアウトカムと曝露レベルの関係のみを解析した研究が主である。

そこで本研究では、これらの研究手法を組み合わせ、出生コホートおよび職業曝露地域住民を対象に、化学物質の曝露影響およびその毒性発現メカニズムの探索を、オミクス解析を用いて試みた。

## 2. 研究の目的

本研究では、化学物質の曝露が、細胞・体液中に数千種類存在する低分子代謝物 (メタボローム) 組成の変化を通じて健康影響を引き起こすと仮説を立てた。仮説検証のため、申請者らが運営する出生コホート調査より得られた体液・糞便試料中のメタボロームを測定し、化学物質濃度との関係を多変量解析により解明することで、化学物質の曝露に伴う体液・糞便中メタボロームを軸とした生体内パスウェイの変化を観察することを目的とした。さらに、得られたマーカーやマーカーが関連する代謝パスウェイの機能を Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) などのオンラインデータベースにより解析することで、化学物質曝露がヒトに影響するメカニズムについても調査を試みた。

更に、曝露影響の解析として、化学物質曝露と出生時のアウトカムとの関係解析を試みた。また、共同研究として動物実験において化学物質曝露を行った実験動物の代謝の変化に関する研究についても実施した。

## 3. 研究の方法

本研究では、千葉大学が主導する C-MACH コホートより得られた血清・便試料中の残留性有機汚染物質 (POPs)、メタボロームの測定および、過去に他研究において採取済みのベトナム鉛バッテリーリサイクル地域居住者の尿試料中のメタボローム測定を中心に研究を実施した。

血清中のポリ塩化ビフェニル (PCBs) および *p,p'*-DDE 濃度はガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS)、血清・尿試料中メタボロームは高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (HPLC-MS/MS)、便中メタボローム濃度はガスクロマトグラフ-タンデム質量分析計 (GC-MS/MS) を用いて同定、定量した。

解析手法には既存の統計手法に加え、混合物の曝露影響解析として複合曝露影響の解析には Weighted Quantile Sum (WQS) Regression を用いた。アウトカムや化学物質曝露濃度と関連するメタボロームの解析には、正規化付き回帰モデルや Data Integration Analysis for

Biomarker discovery using Latent cOmponents (DIABLO) など、機械学習に基づく手法を用いて解析を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) C-MACH コホートにおける調査

まず、児の出生体重と化学物質曝露の関係について調査を行った。POPs である PCBs の曝露と出生体重について、複数の手段で解析を試みたところ、PCBs の曝露に伴い、児の出生体重が低下する傾向が示された (Figure 1)。しかし、重金属類については明確な出生体重との関係は認められなかった。また、頭囲については母体の化学物質曝露との関係は認められなかった。本研究の結果は国際誌に投稿、受理された。

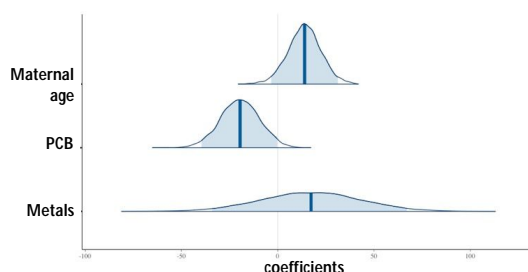


Figure 1: Empirical mean of coefficients (coefficients), and 95%CI in the Bayesian regression model for birth weight (PCBs: lipid basis)

続けて、209 種類存在する PCBs 異性体ごとの影響について、検出された 12 異性体について WQS Regression を用いて解析した。WQS Regression は複数の互いに相関する化学物質濃度を 1 つの曝露指標に次元圧縮し、アウトカムとの関係を解析するための手法である。これにより多重共線性による影響を除去できるだけでなく、アウトカムへの各化学物質の重みも算出できる点が優れている。解析の結果、児の出生体重とは有意な負の関係が認められた。一方で、異性体に特異的なアウトカムとの関係は認められず、特定の異性体が出生体重の低下に関与している可能性は、本研究では認められなかった。また、本研究において曝露影響は児の性差との関係は認められなかった。本研究結果は国際誌へ投稿準備中である。

さらに、便試料が採取された 58 名の検体について、PCBs および  $p,p'$ -DDE、便中メタボローム、血清中メタボローム、腸内細菌叢組成の関係について、DIABLO 法を用いて解析を試みた。解析の結果、PCBs、 $p,p'$ -DDE それぞれの母体血清中濃度が上位 1/4、下位 1/4 の群を予測する判別モデルを便中メタボローム、血清中メタボローム、腸内細菌叢組成から作成したところ、これらの組成からは十分な判別性能を持つモデルを構築することは困難であった。一方、PCBs、 $p,p'$ -DDE それぞれの判別モデルにおいて、上位下位を分けるために重要な因子を比較したところ、血清中における PCBs、 $p,p'$ -DDE 濃度が強く相関しているにも関わらず、これらの判別の際に重要な因子群は異なることが示唆された (Figure 3)。

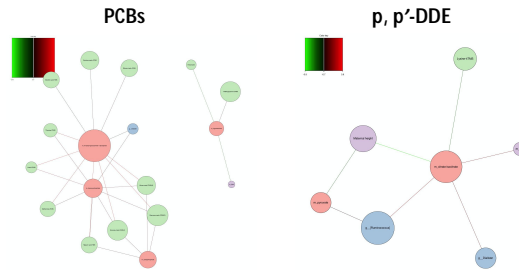


Figure2: Network diagram between metabolomes associated with PCBs and  $p,p'$ -DDE. Red: serum metabolome, Green: feces metabolome, Blue: feces bacteria, Purple: characteristics

モデルの精度が不十分であるため、将来的にさらなる検証が必要だが、類似の構造を持つ物質について、異なる代謝物・腸内細菌叢が関与している可能性が示唆された点は興味深い。本結果についても解析をまとめ、国際誌への投稿を検討する。

## (2) ベトナム鉛バッテリーリサイクル地域住民尿中のメタボローム解析

本研究は愛媛大学および千葉大学の倫理委員会より承認を受けた研究である。研究対象は成人のみとし、ベトナムの鉛バッテリーリサイクル地域住民、対照地域住民より採取した尿検体を測定に供した。血中鉛濃度は先行研究により報告された値を利用した。

得られた尿中メタボロームデータは、データクリーニングおよび白色化の後、正則化付き線形回帰分析、正則化付きロジスティック回帰分析、Mann–Whitney U test、

Spearman's rank test の 4 種手法で解析を試み、3 種以上の手法で抽出されたメタボロームを鉛曝露のバイオマーカー候補とした。この際、正則化付きロジスティック回帰分析、Mann–Whitney U test は目的変数を居住地域、正則化付き線形回帰分析および Spearman's rank test においては血中鉛濃度をアウトカムとして解析を試みた。抽出した因子は MBROLE2 により enrichment analysis を行った。この結果、false discovery rate (FDR) < 0.05 で抽出されたパスウェイを曝露により変動した生体内パスウェイとして解析を試みた。

データ解析の結果、10 種の尿中メタボロームが鉛曝露を反映するマーカー候補物質として抽出した。さらに enrichment analysis の結果、それらはアミノ酸・ポルフィリンの代謝に関わるパスウェイに関連していた。また、変動していたパスウェイの機能について解析したところ、変動していたマーカーは中枢神経毒性や膀胱へのダメージ、ヘム合成に関連するパスウェイに属しており、鉛バッテリーリサイクルを通じた鉛曝露が、ヒトの代謝系を通じてヒトの健康に影響を及ぼしている可能性が示唆された (Figure 3)。本研究の結果は国際誌に投稿、受理された。

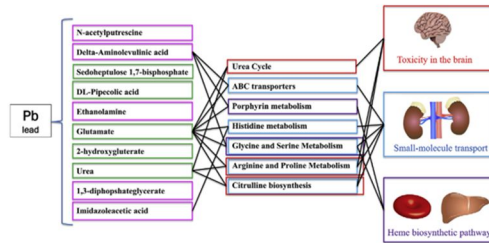


Figure 3: Potential biological pathways and outcomes related to Pb exposure. \* Pink box: positive correlation with Pb levels; green: negative correlation with Pb levels; red: toxicity in the brain; blue: small-molecule transport; purple: heme biosynthetic pathway. \*\*Organs:© 2016 DBCLS TogoTV/CC-BY4.0 (Eguchi et al., 2018. Environmental pollution, 242, 98-105. CC-BY4.0)

### (3) その他の関連する共同研究

愛媛大学のチームと共同研究を行い、PCB 曝露に伴うイヌ脳中メタボローム組成の変動に関する研究および、ビスフェノール A を曝露したラットの仔肝臓中のリピドーム組成の変動に関する研究に参与した。イヌ脳中メタボローム組成の変動に関する研究においては、orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis 法を用いたデータ解析・MBROLE による enrichment analysis に、ラットの仔肝臓中のリピドーム組成の変動に関する研究に関しては、脂質組成のアノテーションに参与した。これらの研究はいずれも国際誌に投稿、受理された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nomiyama Kei, Eguchi Akifumi, Takaguchi Kohki, Yoo Jean, Mizukawa Hazuki, Oshihoi Tomoko, Tanabe Shinsuke, Iwata Hisato	4. 巻 377
2. 論文標題 Targeted metabolome analysis of the dog brain exposed to PCBs suggests inhibition of oxidative phosphorylation by hydroxylated PCBs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114620 ~ 114620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.taap.2019.114620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Eguchi Akifumi, Nomiyama Kei, Sakurai Kenichi, Kim Trang Pham Thi, Viet Pham Hung, Takahashi Shin, Iwata Hisato, Tanabe Shinsuke, Todaka Emiko, Mori Chisato	4. 巻 242
2. 論文標題 Alterations in urinary metabolomic profiles due to lead exposure from a lead/acid battery recycling site	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 98 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envpol.2018.06.071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Akifumi Eguchi, Kana Yanase, Midori Yamamoto, Kenichi Sakurai, Masahiro Watanabe, Emiko Todaka, Chisato Mori	4. 巻 -
2. 論文標題 The relationship of maternal PCB, toxic and essential trace element exposure levels with birth weight and head circumference in Chiba, Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental Science and Pollution Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11356-019-05009-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nguyen Hoa Thanh, Li Lingyun, Eguchi Akifumi, Kannan Kurunthachalam, Kim Eun-Young, Iwata Hisato	4. 巻 759
2. 論文標題 Effects on the liver lipidome of rat offspring prenatally exposed to bisphenol A	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science of The Total Environment	6. 最初と最後の頁 143466 ~ 143466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scitotenv.2020.143466	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Akifumi Eguchi, Kenichi Sakurai, Tamotsu Kato, Yumiko Nakanishi, Hiromi Tanabe, Yumi Sato, Midori Yamamoto, Masahiro Watanabe, Hiroshi Ohno, Chisato Mori
2. 発表標題 Relationship between metabolome and gut-microbiome profiles and exposure levels of PCBs and p, p'-DDE in C-MACH cohort
3. 学会等名 第21回環境ホルモン学会研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akifumi Eguchi, Kenichi Sakurai, Tamotsu Kato, Yumiko Nakanishi, Hiromi Tanabe, Yumi Sato, Midori Yamamoto, Masahiro Watanabe, Hiroshi Ohno, Chisato Mori
2. 発表標題 Alterations in profiles of metabolome and gut-microbiome due to lead exposure PCBs and p, p'-DDE in C-MACH cohort
3. 学会等名 Society of Toxicology 58th Annual Meeting and ToxExpo (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eguchi A, Sakurai K, Yamamoto M, Watanabe M, Todaka E, Mori C
2. 発表標題 Relationship between residue levels of PCBs, p, p'-DDE, PBDEs and trace elements in maternal and umbilical cord serum from Chiba, Japan
3. 学会等名 ISEE/ES AC 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Yanase, A. Eguchi, M. Yamamoto, K. Sakurai, M. Watanabe, E. Todaka, and C. Mori
2. 発表標題 Association between Maternal Exposure to PCBs and Head Circumference of Male Newborns at Birth in Chiba Birth Cohort (C-MACH)
3. 学会等名 Society of Toxicology 58th Annual Meeting and ToxExpo (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eguchi A, Sakurai K, Yamamoto M, Watanabe M, Hisada A, Takahashi T, Todaka E, Mori C
2. 発表標題 Association between levels of individual PCB congeners in maternal serum with birth weight of newborn in C-MACH study
3. 学会等名 Society of Toxicology 60th Annual Meeting and ToxExpo (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://researchmap.jp/siero5335">https://researchmap.jp/siero5335</a> <a href="https://scholar.google.com/citations?user=in2F1HwAAAAJ">https://scholar.google.com/citations?user=in2F1HwAAAAJ</a> Researchgate <a href="https://www.researchgate.net/profile/Akifumi_Eguchi">https://www.researchgate.net/profile/Akifumi_Eguchi</a> Researchmap <a href="https://researchmap.jp/siero5335/">https://researchmap.jp/siero5335/</a> Google scholar <a href="http://scholar.google.com/citations?user=in2F1HwAAAAJ">http://scholar.google.com/citations?user=in2F1HwAAAAJ</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------